



19 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT

12 Patentschrift  
10 DE 199 23 761 C 1

51 Int. Cl.<sup>7</sup>:  
G 01 N 1/36  
G 01 N 27/62  
H 01 J 49/02

21 Aktenzeichen: 199 23 761.1-52  
22 Anmeldetag: 21. 5. 1999  
43 Offenlegungstag: -  
45 Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung: 8. 2. 2001

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden.

73 Patentinhaber:  
Bruker Daltonik GmbH, 28359 Bremen, DE

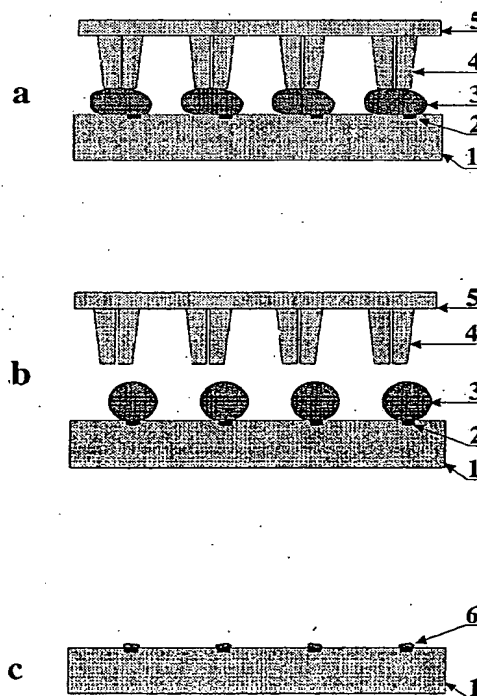
72 Erfinder:  
Franzen, Jochen, 28359 Bremen, DE

56 Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht  
gezogene Druckschriften:

DE 196 28 178 C1  
DE 197 54 978 A  
DE 197 12 195 A1  
DE 196 18 032 A1  
DE 196 17 011 A1  
US 54 98 545 A  
WO 99 00 657 A1

54 Aufreinigende Probenräger für die MALDI-Massenspektrometrie

57 Die Erfindung betrifft Probenräger für die massenspektrometrische Analyse von großen organischen Molekülen, Verfahren zur Herstellung der Probenräger und Verfahren zum Beladen der Probenräger mit Proben der Moleküle aus vorwiegend wässrigen Lösungen zusammen mit Matrixsubstanz für die Ionisierung der Substanzen durch matrix-unterstützte Laserdesorption (MALDI). Die Erfindung besteht darin, die vorgesehenen Auftragsbereiche für die Lösungströpfchen auf einer ansonsten hydrophoben Probenrägeroberfläche fest mit definierten Mengen von Ionenaustauschermaterialien zu belegen. Die Ionenaustauschermaterialien können aufpolymerisiert oder aufgeklebt werden; sie sind naturgegeben hydrophil und dienen den Probenrägertröpfchen als Anker für das Aufsitzen auf dem Probenräger und für die Kristallisation während des Trocknungsvorganges. Sie entziehen dem eintrocknenden Lösungstropfen alle für den MALDI-Prozess schädlichen Metallionen und lassen sich durch Waschen in definierten Pufferlösungen für die Wiederverwendung regenerieren.



DE 199 23 761 C 1

DE 199 23 761 C 1

## Beschreibung

Die Erfindung betrifft Probenträger für die massenspektrometrische Analyse von großen organischen Molekülen, Verfahren zur Herstellung der Probenträger und Verfahren zum Beladen der Probenträger mit Proben der Moleküle aus vorwiegend wäßrigen Lösungen zusammen mit Matrixsubstanz für die Ionisierung der Substanzen durch matrix-unterstützte Laserdesorption (MALDI).

Die Erfindung besteht darin, die vorgesehenen Auftragsbereiche für die Lösungströpfchen auf einer ansonsten hydrophoben Probenträgeroberfläche fest mit definierten Mengen von Ionenaustauschermaterialien zu belegen. Die Ionenaustauschermaterialien können aufpolymerisiert oder aufgeklebt werden; sie sind naturgegeben hydrophil und dienen den Probentröpfchen als Anker für das Aufsitzen auf dem Probenträger und für die Kristallisation während des Trocknungsvorganges. Sie entziehen dem eintrocknenden Lösungstropfen alle für den MALDI-Prozess schädlichen Metallionen und lassen sich durch Waschen in definierten Pufferlösungen für die Wiederverwendung regenerieren.

## Stand der Technik

Für die Analyse von großen organischen Molekülen, wie beispielsweise denen der Kunststoffe oder Biopolymere, hat sich die Massenspektrometrie mit Ionisierung durch matrix-unterstützte Laserdesorption und Ionisierung (MALDI = Matrix-Assisted Laser Desorption and Ionization) als ein Standardverfahren etabliert. Meist werden dazu Flugzeit-massenspektrometer (TOF-MS = Time-Of-Flight Mass Spectrometer) verwendet, es können hier aber auch Ionenzyklotron-Resonanzspektrometer (FT-ICR = Fourier-Transform Ion Cyclotron Resonance) oder Hochfrequenz-Quadrupol-Ionenfallenmassenspektrometer (kurz: Ionenfallen) eingesetzt werden. Im folgenden werden die großen Moleküle, die untersucht werden sollen, einfach "Analytmoleküle" genannt. Die Analytmoleküle befinden sich in aller Regel sehr verdünnt in wäßriger Lösung, rein oder vermischt mit organischen Lösungsmitteln.

Unter "Biopolymeren" sollen hier besonders die Oligonukleotide (also das Genmaterial in seinen verschiedenen Ausformungen wie DNA oder RNA), Polysaccharide und Proteine (also die wesentlichen Bausteine der lebenden Welt) verstanden werden, einschließlich ihrer besonderen Analoge und Konjugate, wie beispielsweise Glycoproteine oder Lipoproteine.

Die Auswahl der Matrixsubstanz für MALDI hängt von der Art der Analytmoleküle ab; es sind inzwischen weit über hundert verschiedene Matrixsubstanzen bekannt geworden. Die in hohem Überschuß eingesetzten Matrixsubstanzen haben dabei unter anderem die Aufgabe, die Analytmoleküle möglichst zu vereinzeln und am Probenträger anzubinden, während des Laserschusses durch Bildung einer Dampf-wolke möglichst ohne Zerstörung der Analytmoleküle und möglichst ohne Anlagerung der Matrixmoleküle oder anderer Moleküle in die Gasphase zu übertragen, und schließlich unter Protonierung oder Deprotonierung zu ionisieren. Für diese Aufgabe hat es sich als günstig erwiesen, die Analytmoleküle in irgendeiner Art einzeln in die Kristalle der Matrixsubstanzen bei deren Kristallisation oder zumindest feinverteilt in die Grenzflächenbereiche zwischen den Kriställchen einzubauen. Es scheint dabei wesentlich zu sein, die Analytmoleküle voneinander zu trennen, also keine Cluster von Analytmolekülen in der aufgetragenen Probe zuzulassen.

Für das Auftragen von Analyt und Matrix sind eine Reihe verschiedener Methoden bekannt geworden. Die einfachste

davon ist das Aufpipettieren einer Lösung mit Analyt und Matrix auf einen gereinigten, metallischen Probenträger. Der Lösungstropfen bildet auf der Metalloberfläche eine Benetzungsfläche, deren Größe auf rein hydrophilen Oberflächen einem Mehrfachen eines Tropfendurchmessers entspricht und von der Hydrophilität der Metalloberfläche und den Eigenschaften des Tröpfchens, insbesondere des Lösungsmittels, abhängt. Es bildet sich dabei nach dem Auftrocknen der Lösung ein Probenfleck aus kleinen Matrixkriställchen in der Größe dieser Benetzungsfläche, wobei sich in der Regel aber keine gleichmäßige Belegung der Benetzungsfläche zeigt. Die Kriställchen der Matrix beginnen in wäßrigen Lösungen in der Regel am Rand der Benetzung der Metallplatte mit dem Probentröpfchen zu wachsen. Sie wachsen zum Inneren der Benetzungsfläche hin. Häufig bilden sie strahlenartige Kristalle, wie zum Beispiel bei 5-Dihydroxybenzoesäure oder 3-Hydroxypicolinsäure, die sich zum Inneren des Flecks hin oft von der Trägerplatte abheben. Das Zentrum des Flecks ist häufig leer oder mit feinen Kriställchen bedeckt, die aber oft wegen ihrer hohen Konzentration an Alkalisalzen kaum für die MALDI-Ionisierung brauchbar sind. Die Beladung mit Analytmolekülen ist sehr ungleichmäßig. Diese Belegungsart erfordert daher während der MALDI-Ionisierung eine visuelle Betrachtung der Probenträgeroberfläche durch ein Videomikroskop, das an allen kommerziell hergestellten Massenspektrometern für diese Art von Analysen zu finden ist. Ionenausbeute und Massenauflösung schwanken im Probenfleck von Ort zu Ort. Es ist oft ein mühsamer Vorgang, eine günstige Stelle des Probenflecks mit guter Analytionenausbeute und guter Massenauflösung zu finden, und nur Erfahrung und Ausprobieren hilft hier bisher weiter.

Bei anderen Auftragungsmethoden ist die Matrixsubstanz bereits vor dem Aufbringen der Lösungsmitteltröpfchen, die nun nur die Analytmoleküle enthalten, auf der Trägerplatte vorhanden.

Es ist nun beim Antragsteller eine Methode entwickelt worden, die mit sehr kleinen hydrophilen Ankerbereichen von etwa 200 bis 400 Mikrometer Durchmesser in einer ansonsten hydrophoben Oberfläche zu sehr definierten Kristallisierungsbereichen führt (DE 197 54 978 A1). Die Tropfen werden durch die hydrophilen Anker eingefangen, und genau auf diesen hydrophilen Ankern entstehen relativ dichte und geschlossene Kristallkonglomerate. Es konnte gezeigt werden, daß sich entsprechend dem verkleinerten Oberflächenverhältnis die Nachweisgrenze für Analytmoleküle verbessert. Es kann daher bei der Probenaufbereitung mit kleineren Analytmengen und verdünnteren Lösungen gearbeitet werden, ein Vorteil, der sich in besser ablaufenden biochemischen Vorbereitungsschritten niederschlägt und zu niedrigeren Kosten beim Chemikalienverbrauch führt.

Es soll hier unter einer "hydrophoben" Oberfläche eine benetzungsfeindliche und flüssigkeitsabweisende Oberfläche für die benutzte Probenflüssigkeit verstanden werden, auch wenn es sich dabei nicht um eine wäßrige Probenlösung handeln sollte. Im Falle einer öligen Probenlösung soll es sich also entsprechend um eine lipophobe Oberfläche handeln. In der Regel lösen sich jedoch die Biomoleküle am besten in Wasser, manchmal unter Zugabe von organischen, wasserlöslichen Lösungsmitteln wie Alkoholen oder Acetonitril.

Entsprechend soll unter einer "hydrophilen" Fläche eine benetzungsfreundliche Fläche für die Art der benutzten Probenflüssigkeit gemeint sein, auch wenn es sich dabei nicht um eine wäßrige Lösung handeln sollte.

Die Hydrophobizität kann im Prinzip aus dem Anstellwinkel ermittelt werden, den die Flüssigkeit unter normierten Bedingungen am Rande der Benetzungsfläche mit der

festen Oberfläche ausbildet. Für Tröpfchen auf einer stark hydrophoben Oberfläche gibt es aber den Fall, daß sich überhaupt keine Benetzungsfläche ausbildet und es daher auch keinen Anstellwinkel gibt, wie es zum Beispiel für Quecksilbertropfen auf einer Glas- oder Holzplatte zu finden ist.

Die Kristallkonglomerate, die sich auf den hydrophilen Ankerflächen bilden, zeigen eine feinkristalline Struktur, die günstig für den MALDI-Prozess ist. Die Struktur wird umso feiner, je schneller der Trocknungsvorgang ist.

Es ergeben sich jedoch auch Nachteile aus dieser Methode. Der MALDI-Prozeß wird durch die Anwesenheit von Metallionen, insbesondere von Alkaliionen, erheblich gestört, und Alkaliionen bilden zusätzlich häufig Addukte wechselnder Größe mit den Analytmolekülen, die eine genaue Massenbestimmung verhindern. Die Konzentration an Alkaliionen in der Probelösung ist durch vorhergehende Reinigungsschritte durchaus sehr niedrig, aber trotzdem störend. Trotz der Reinigungsschritte ist bei verdünnteren Analytkonzentrationen die Zahl der Alkaliionen zu den Analytmolekülen im allgemeinen in ungünstiger Weise höher als bei konzentrierteren Lösungen. Bei den bisherigen, relativ konzentriert benutzten Probenlösungen konnten zudem die Alkaliionen durch den Kristallisierungsvorgang aus den Kristallen aus Matrixsubstanz und Analytmolekülen herausgehalten werden, sie wurden häufig in der Mitte des Flecks abgelagert und durch Fokussierung des Laserstrahles auf den Rand des Flecks außerhalb des MALDI-Geschehens gelassen.

Bei der neuen Aufbringungsmethode mit verdünnteren Lösungen auf sehr kleinen hydrophilen Ankern tritt das Problem mit Alkaliionen in den Vordergrund. Manchmal gelingt es, durch langsames Trocknen der Probenlösungströpfchen die Alkaliionen durch späte Auskristallisation bevorzugt auf der Oberfläche des Kristallkonglomerats abzulagern, wodurch sich die Alkaliionen durch einige vorausgehende Laserschüsse abtragen lassen. Das langsame Trocknen führt jedoch andererseits wiederum zu einem grobkörnigeren Kristallkonglomerat, was für die MALDI-Ionisierung von schweren Analytmolekülen nicht so günstig ist.

Die restlose Entfernung aller Alkaliionen aus der Probelösung ist ganz grundsätzlich außerordentlich schwierig. Da die Alkaliionen ubiquitär sind, geraten sie leicht bei jedem Pipettierschritt, bei jedem Probenauftrag, ja selbst bei Stehenlassen der Probelösungen wieder in die Lösungen hinein, entweder aus der Umgebungsluft (besonders über winzige Schwebeteilchen, wie sie beispielsweise im Zigarettenrauch enthalten sind) oder durch Diffusion aus den Gefäßwänden. Zwar sind Gefäße aus Glas inzwischen aus den betreffenden Laboratorien verbannt, aber auch Kunststoffgefäße enthalten Alkalien in beträchtlicher Menge. Eine der Quellen für Alkaliionen ist der metallische Probenenträger selbst, bei dem trotz extrem guten Waschens immer wieder Alkaliionen aus dem Inneren des Trägers an die Oberfläche diffundieren.

Leider wirken die Alkaliionen umso störender, je weiter man an die Nachweisgrenze für die Analyten herangeht.

Es ist aus verschiedenen Quellen bekannt geworden, daß die Zugabe einiger Bröckchen oder Kügelchen aus Ionenaustauschermaterial zu dem Tröpfchen auf dem Probenenträger eine Verbesserung der MALDI-Ergebnisse bringt. Diese Zugabe ist aber schwierig, es gelingt kaum, definierte Mengen aufzubringen. Die dadurch entstehende unregelmäßige Form der Oberfläche stört die Beschleunigung der Ionen, die ein homogenes elektrisches Feld erfordert. Es ist auch der Versuch gemacht worden, die Kügelchen nach dem Eintrocknen der Probelösung wieder abzukratzen. Allen diesen Maßnahmen ist aber eigen, daß sie viel geschickt-manuelle

Arbeit erfordern und einer Automatisierung im Wege stehen.

Auch die Verwendung von Nafion® (Du Pont), einem Membranpolymer auf der Basis von Poly(Perfluoralkylen)-Sulfonsäure, das sich aus einer Lösung als Membran auf Oberflächen aufbringen läßt, ist für die Aufreinigung von MALDI-Proben auf dem Probenenträger bekannt geworden.

Ionenaustauscher werden in größerem Maßstab industriell hergestellt, und in Form von Teilchenpulvern oder -schottern ausgesuchter Größen und Formen in den Handel gebracht. Handelsnamen sind beispielsweise Permutit®, Dowex®, Wofatit® oder Sephadex®.

Kationenaustauscher für die Bindung von metallischen Ionen enthalten an inneren oder äußeren Oberflächen viele negativ-ionische Gruppen wie beispielsweise Sulfonsäuregruppen  $\text{SO}_3^-$ , die positive Ionen zu binden vermögen. Sie werden gewöhnlich in protonierter Form eingesetzt, das heißt, zu Beginn der Austauschertätigkeit sind die negativen Ionengruppen durch  $\text{H}^+$ -Ionen abgesättigt. Diese Protonen werden durch positive Metallionen ersetzt, die eine höhere Affinität zu den negativen Ionen des Austauschers besitzen. Dabei werden die Wasserstoffionen (Protonen) an die umgebende Flüssigkeit abgegeben, die daher durch Ansteigen der Protonenkonzentration immer saurer wird. Stark saure Lösungen verhindern jedoch Trocknung und gute Kristallisation. Es ist daher mit Erfolg versucht worden, nicht protonierte Ionenaustauscher zu verwenden, sondern mindestens teilweise durch Ammoniumionen ( $\text{NH}_4^+$ ) belegte Austauscher. Zumindest die besonders für den MALDI-Prozess schädlichen Alkaliionen haben eine höhere Affinität zum Austauscher als Ammoniumionen und verdrängen daher diese von ihren Plätzen.

#### Aufgabe der Erfindung

Es ist die Aufgabe der Erfindung, die störenden Metallionen, insbesondere die Alkaliionen, in definierter und automatisierbarer Weise möglichst vollständig aus der Probelösung zu entfernen. Da ein Teil der Alkaliionen vom Probenenträger selbst in die Probelösung gerät, soll die Entfernung stattfinden, während sich der Tropfen auf der Oberfläche des Trägers befindet und eintrocknet.

#### Erfindungsgedanke

Es ist der Grundgedanke der Erfindung, die Oberfläche eines ansonsten hydrophoben Probenenträgers mit kleinen hydrophilen Belegungsbereichen als Anker für die Probetröpfchen zu versehen, wie schon beim Antragsteller methodisch entwickelt, aber nunmehr die hydrophilen Ankerbereiche kationenaustauschend auszubilden. Das kann durch eine Oberflächenkonditionierung geschehen, die negativ geladene Molekülgruppen, beispielsweise Sulfonsäuregruppen ( $\text{SO}_3^-$ ) oder Carbonsäuregruppen ( $\text{COO}^-$ ), an die Oberfläche bindet, oder auch durch Aufbringen einer ionenaustauschenden Schicht aus einer Lösung, oder durch Aufpolymerisieren oder Aufkleben einer Schicht aus Ionenaustauschermaterial. Die Schichten können als Folien, als Membranen oder aber auch als Belegungen mit feinkörnigem Pulver aus regelmäßig oder unregelmäßig geformten Partikeln aufgebracht werden. Sie können entweder sehr dünn auf der Oberfläche aufsitzen, oder aber auch kleine Vertiefungen der Oberfläche ausfüllen, um insgesamt einen möglichst ebenen Probenenträger zu erhalten.

Ionenaustauschermaterial ist naturgemäß sehr hydrophil und kann daher hervorragend dazu verwendet werden, hydrophile Ankerbereiche für die Probetröpfchen auf einer ansonsten hydrophoben Oberfläche zu bilden.

Als Ionenaustauschermaterial können beispielsweise Zeolithe verwendet werden. Diese Aluminiumsilikatgerüste haben den Vorteil, beim Trocknen nicht zu schrumpfen. Andererseits geben sie Wasser oder andere Lösungsmittel nur sehr langsam wieder ab, sie sind daher für die Aufrechterhaltung des Hochvakuums in der MALDI-Ionenquelle nicht sonderlich geeignet. Besser geeignet sind polymere Ionenaustauscher wie die oben bereits erwähnten kommerziell erhältlichen Produkte, meist auf der Basis sulfonierter Styrol-Divinylbenol- oder Styrol-Acrylsäure-Copolymeren, die nach Regeneration mit leichten Säuren durch eine Vielzahl von  $H^+$ -Ionen neutralisiert sind, aber bei Vorhandensein von Metallionen diese sofort aufnehmen und gegen die  $H^+$ -Ionen austauschen. Diese porösen, polymeren Ionenaustauscher sind praktisch unlöslich, sie kommen in Form kleiner Kügelchen oder auch als unregelmäßig geformte Partikel aus-gesiebter Größen in den Handel.

Die Übersäuerung der Probenlösung durch die zusätzlichen  $H^+$ -Ionen läßt sich vermeiden, indem die  $H^+$ -Ionen zunächst in einer Ammoniumsalzlösung durch Ammoniumionen ( $NH_4^+$ ) ersetzt werden. Die sich beim Probenauftrag in der Probelösung anreichernden Ammoniumionen, die sich nach dem Trocknen in den Kristallkonglomeraten wiederfinden, stören den MALDI-Prozeß nicht, sie scheinen im Gegenteil den MALDI-Prozeß günstig zu beeinflussen.

Da manche Ionenaustauschermaterialien in Flüssigkeit quellen und beim Trocknen schrumpfen, kann es leicht passieren, daß aufliegende Kristalle durch das Schrumpfen der Unterlage abgesprengt werden. Es ist daher eine Weiterbildung des Erfindungsgedankens, in die Schicht aus Ionenaustauschermaterial nichtschrumpfende Materialien als Gerüst einzulagern, auf denen die Kristallkonglomerate aufsitzen können. Besonders geeignet dazu sind Metallpartikelchen, die auch ein gleichmäßiges elektrisches Potential an der Oberfläche schaffen können.

Beobachtet man unter dem Mikroskop ein trocknendes Tröpfchen, so sieht man im Tröpfchen eine extrem starke Verwirbelung, die durch die unregelmäßigen Vorgänge des Wärmenachschubs und der Verdunstung erzeugt werden. Das Tröpfchen bleibt auch bei seiner ständigen Verkleinerung weiterhin flüssig, erst zuletzt findet eine fast schlagartige Auskristallisierung statt. Die Verdunstung ist deswegen so unregelmäßig, weil sie durch Sättigungseffekte und Dichteänderungen der äußeren Luft auch äußere Luftwirbel erzeugt, die wiederum eine unregelmäßig über die Tröpfchenoberfläche verteilte Verdunstung nach sich zieht. Diese starke Verwirbelung im Tröpfchen ist in besonderem Maße geeignet, die im Tröpfchen vorhandenen Alkaliionen zum unterliegenden Ionenaustauscher zu transportieren, durch den hindurch notwendigerweise auch der Wärmenachschub stattfindet. Eine solch starke Verwirbelung ist bei einem flach auf eine größere hydrophile Fläche aufgetragenen Tröpfchen nicht zu beobachten, die Wirkung der ionenaustauschenden Ankerfläche ist daher überraschenderweise bei kleiner Ankerfläche besonders wirksam.

#### Beschreibung der Bilder

Fig. 1 zeigt eine Folge a, b und c von schematischen Darstellungen zum Aufbringen des Probentropfchens (3) auf den Probenträger (1) mit den hydrophilen, ionenaustauschenden Bereichen (2) aus den Pipettenspitzen (4) einer Vielfachpipette (5) mit nachfolgendem Eintrocknen.

(a) Die Pipetten haben die Lösungströpfchen (3) aus ihrer Spitze (4) ausgedrückt, die Tröpfchen (3) sind zwischen Pipettenspitzen (4) und Probenträger (1) plattgedrückt. Dadurch erreichen die Tröpfchen ihre

hydrophilen, ionenaustauschenden Ankerbereiche (2), auch wenn die Pipettenspitzen (4) nicht genau über dem Ankerbereich (2) stehen, und benetzen dort den Probenträger (1).

(b) Die Pipettenspitzen (4) sind abgehoben, die Tröpfchen (3) haben die Form von Kugeln angenommen und stehen genau über ihren hydrophilen, ionenaustauschenden Ankerbereichen (2). Das Eintrocknen der Probetröpfchen (3) führt zu einer starken Verwirbelung der Flüssigkeit im Tröpfchen, die die Alkaliionen zum Ionenaustauscher führt, wo sie festgehalten und so dem Flüssigkeitströpfchen entzogen werden.

(c) Die Probentropfchen sind eingetrocknet und hinterlassen kleine, monolithische Blöcke (6) genauer Ortsbegrenzung mit mikrokristallinem Gefüge auf den hydrophilen, ionenaustauschenden Bereichen (2) des Probenträgers (1). Die Alkaliionen sind den Kristallen entzogen, ideal für den nachfolgenden MALDI-Prozeß.

#### Besonders günstige Ausführungsformen

Die Oberflächen normalerweise verwendeter für MALDI-Proben verwendeter metallischer Probenträger sind in der Regel von Natur aus leicht hydrophil gegenüber den wäßrigen Probenlösungen, ein Probentropfchen fließt normalerweise etwas auseinander. Die Hydrophilität wird durch die Hydroxygruppen erzeugt, die sich unter der Einwirkung von feuchter Luft auf jedem Metall (selbst auf Edelmetallen) bilden.

Es ist aus Gründen einfacher Herstellung durchaus zweckmäßig, bei Probenträgern nach dieser Erfindung aus Metall oder metallisiertem Kunststoff zu bleiben, jedoch die Oberfläche hydrophob zu machen. Das kann beispielsweise durch einen hauchdünnen, hydrophoben Lack geschehen, oder aber durch Aufkleben einer dünnen, hydrophoben Folie, beispielsweise aus Teflon®. Es kann auch die Metalloberfläche durch eine monomolekulare, chemische Veränderung hydrophob gemacht werden, beispielsweise aus fluorierten C18-Ketten, die über Schwefelbrücken chemisch gebunden werden, da dann eine gewisse elektrische Leitfähigkeit erhalten bleibt. Es sind auch sehr dünne Schichten aus fluoriertem Keramik zur Hydrophobisierung bekannt geworden. Es gibt jedoch viele andere, äquivalente Methoden der Hydrophobisierung, zum Beispiel unter Verwendung von Silikonen, Alkylchlorosilanen oder zinnorganischen Verbindungen.

Die hydrophilen Ankerbereiche für die Probentropfchen können auf vielerlei Weise erzeugt werden. Ein Beispiel ist das Abdecken der gewünschten Ankerbereiche vor der Hydrophobisierung mit einem abwaschbaren oder hydrophilen Lack. Um genügend kleine Punkte zu erhalten, kann der Decklack in Form kleinster Tröpfchen mit einer piezobetriebenen Tröpfchenpipette nach Art der Tintenstrahl-Drucker aufgeschossen werden. Es ist damit eine außerordentlich gute Ortspräzision der Lackpunkte erreichbar. Nach der Hydrophobisierung können die Lackpunkte einfach abgewaschen werden. Die hydrophilen Ankerbereiche können aber auch in sehr einfacher Weise durch Zerstörung der hydrophoben Schicht erzeugt werden. Das kann durch Aufdrucken (beispielsweise wieder nach Art der Tintenstrahl-Drucker) von chemisch verändernden oder enzymatisch abbauenden Substanzlösungen geschehen, durch Zerstören mit glühenden Brennspitzen, aber auch durch Ablation von Oberflächenmaterial, beispielsweise durch Funkenerosion oder Laserbeschuß.

Die hydrophilen Ankerflächen haben zweckmäßigerweise Durchmesser zwischen 100 und 500 Mikrometern,

solche von 200, 300 und 400 Mikrometern haben sich für verschiedenartige Anwendungen als günstig erwiesen.

Sind hydrophile Ankerbereiche erzeugt, so ist das Aufbringen der ionenaustauschenden Schichten nicht allzu schwierig. So kann beispielsweise Nafion® in Lösung aufgetragen werden. Die Lösung bildet auf den hydrophilen Ankern kleine Tröpfchen, die nach dem Verdunsten des Lösungsmittels je einen Nafion-Film zurücklassen. Es kann aber auch ein Klebstoff in Lösung aufgetragen werden, der nach fast vollendetem Trocknen mit einem Pulver aus Ionenaustauschermaterial satt überstäubt wird. Wird ein Pulver mit Partikeln von etwa 5 bis 20 Mikrometer Durchmesser (mesh 1000) verwendet, so ergibt sich nach festem Andrücken, Trocknen und kräftigem Waschen eine sehr gleichmäßige Belegung, die eine hohe Aufnahmefähigkeit für Alkaliionen hat.

Es ist auch möglich, die Materialien direkt auf der hydrophilen Fläche auszupolymerisieren. Auch hier erleichtert die Hydrophilie ein gleichmäßiges Auftragen.

Die Trägerplatten mit den ionenaustauschenden Ankerbereichen werden zweckmäßigerweise vor dem Beladen mit Probenröpfchen konditioniert. Dazu werden sie zunächst in leicht saurem Wasser (beispielsweise HCl) gründlich gewaschen, um alle Metallionen zu entfernen und durch Protonen zu ersetzen. Danach werden die Protonen durch Einlegen in eine Lösung von Ammoniumchlorid möglichst vollständig durch Ammoniumionen ersetzt. Die Art der Säure (hier HCl) richtet sich nach der Metallunterlage, diese soll selbstverständlich nicht angegriffen werden.

Die Probenröpfchen werden normalerweise mit Pipetten auf den Probenträger aufgebracht, wie schematisch in Fig. 1 gezeigt. Für das gleichzeitige Aufbringen vieler Probenröpfchen aus Mikrotiterplatten werden Vielfachpipetten verwendet, die von Pipettenrobotern in Pipettenautomaten bewegt werden. Es ist daher günstig, Probenträger in der Größe von Mikrotiterplatten zu verwenden und das Raster der hydrophilen Ankerbereiche an das Raster der Mikrotiterplatten anzupassen. Es ist weiterhin günstig, wenn die Probenträger auch die Form von Mikrotiterplatten haben, da sie dann von den handelsüblichen Pipettierrobotern bearbeitet werden können. Da auf dem Probenträger eine wesentlich höhere Probendichte erreicht werden kann, als es in Mikrotiterplatten möglich ist, kann das Raster auf dem Probenträger viel feiner sein, als es dem Raster der Mikrotiterplatte entspricht. Es kann beispielsweise durch ganzzahlige Teilung des Rasters der Mikrotiterplatten erhalten werden. Es können dann auf einen Probenträger die Proben aus mehreren Mikrotiterplatten aufgebracht werden. Das Grundraster der Ur-Mikrotiterplatte besteht aus 96 kleinen Gefäßen im Raster von 9 Millimetern in einer Anordnung von 8 Reihen mal 12 Spalten. Die Mikrotiterplatten sind aber ohne Veränderung ihrer Größe weiterentwickelt worden, moderne Ausführungsformen zeigen 384 oder sogar 1536 Mikrogefäße im Raster von 4,5 und 2,25 Millimetern. Diese (und noch feinere) Rastermaße lassen sich auch für die ionenaustauschenden Ankerbereiche auf den Probenträgern einrichten, beispielsweise ergibt das Rastermaß von 1,5 Millimeter 3456 Ankerbereiche auf einem Träger.

Die horizontale Ortsgenauigkeit für die Positionierung der Vielfachpipetten über dem horizontal liegenden Probenträger ist auf etwa 200 Mikrometer beschränkt. Die vertikale Ortsgenauigkeit kann leicht durch seitliche Auflageflächen der Vielfachpipetten und Anschlagbolzen auf etwa 50 Mikrometer verbessert werden.

Die Aufgabe der Tröpfchen erfolgt zweckmäßigerweise, wenn sich die Vielfachpipette im Abstand von 300 bis 500 Mikrometer über dem Probenträger befindet. Es werden etwa 500 bis 1500 Nanoliter der Probenlösung aus jeder Pi-

pettenspitze der Vielfachpipette auf den Probenträger pipettiert, wie schematisch in Fig. 1 gezeigt; der Durchmesser der Tröpfchen beträgt dann etwa 1 bis 1,4 Millimeter. Gewöhnlich ist die Menge der Probenlösung in der Pipettenspitze durch ein Gasbläschen abgeschlossen; daher ist im Kanal der Pipettenspitze anschließend keine Lösung mehr vorhanden und die Kontaktkräfte zur hydrophoben Pipettenspitze sind sehr gering.

Die Tröpfchen, die im entspannten Zustand Kugeln mit den oben genannten Durchmessern bilden, sind jetzt zwischen der Pipettenspitze und dem Probenträger zusammengedrückt, wie aus Fig. 1a ersichtlich. Selbst bei einer horizontalen Fehljustierung der Pipettenspitzen können die Tröpfchen ihren jeweils zugeordneten hydrophilen Ankerbereich erreichen und sich dort festsetzen. Beim Abheben der Vielfachpipette verbleiben die Tröpfchen auf dem Probenträger, da sie dort ihre Anker gefunden haben. Sie stellen sich genau über die Ankerbereiche und nehmen ihre ideal runde Gestalt an, wie in Fig. 1b dargestellt.

Die eintrocknenden Tröpfchen bilden im Inneren wirbelartig starke Flüssigkeitsströmungen aus, die es mit sich bringen, daß praktisch alle Metallionen irgendwann zu den ionenaustauschenden Ankerflächen gelangen, wo sie begierig festgehalten werden.

Beim Eintrocknen hinterlassen die Tröpfchen die Kristallkonglomerate mit den Probenmolekülen exakt auf den hydrophilen Ankerbereichen, wie in Fig. 1c schematisch zu sehen ist. Die brockenförmigen MALDI-Präparate haben daher wie gewünscht eine exakte Positionierung an vorbestimmten Stellen, ihre Größe entspricht den Fokusflächen der Laserstrahlen. Sie bieten außerdem eine hohe Ausbeute an Analytationen, und sind somit in idealer Weise für eine automatische erfolgende Analyse vorbereitet.

Diese monolithischen Brocken zeigen überraschenderweise eine sehr gute und von Brocken zu Brocken reproduzierbare Ionisierung der eingebrachten Biomoleküle, mindestens gleich gut wie die mit Mühe gesuchten günstigsten Stellen der bisherigen Präparationen. Die Adduktbildung mit Alkaliionen ist deutlich geringer, meist gar nicht mehr zu erkennen. Wahrscheinlich sind die Analytmoleküle in einer für den Desorptions- und Ionisationsprozeß sehr günstigen Lage an den Korngrenzen der mikrokristallinen Gefügestruktur eingebettet.

Aus einem Tröpfchen von 500 Nanoliter Volumen, das einen Durchmesser von einem Millimeter hat, wird auf einem hydrophilen Anker von 200 Mikrometer Durchmesser ein kleiner, flacher Block von ebenfalls 200 Mikrometer Durchmesser gebildet. Dieser Durchmesser entspricht etwa dem der üblicherweise benutzten Fokusflächen des Laserlichtstrahles. Die eingesetzte Probenmenge kann daher ohne Einbußen an Signal stark reduziert werden. Eine klassische Präparation auf hydrophilen Flächen würde hier einen Fleckdurchmesser von etwa zwei Millimetern ergeben.

Natürlich können die Tröpfchen auch manuell aufgebracht werden, wie es überhaupt viele Verwendungsmöglichkeiten für die hier dargestellten Probenträger gibt, wie es jedem Fachmann auf diesem Gebiet nach diesen Ausführungen einleuchtend sein wird.

Aus Natur und Zielsetzung des Trocknungsvorgangs folgt, daß bestimmte Zusammensetzungen der Probenlösung zu vermeiden sind. So ist eine Beimengung von Tensiden oder Detergenzien schädlich, weil dadurch eine Benetzung der hydrophoben Oberfläche stattfinden kann. Auch eine Beimengung von solchen organischen Lösemitteln, die eine Benetzung hervorrufen, ist zu vermeiden. Auch hier ist es jedem Fachmann nach diesen Ausführungen verständlich, wie er das Verfahren der Probenvorbereitung und des Aufpipettierens vorzunehmen hat, um eine fehlerhafte Pro-

benaufragabe zu vermeiden.

Sowohl hydrophobe wie auch hydrophile Oberflächen können bei langer Lagerung in Umgebungsluft ihre Benetzungseigenschaften durch Belegung der Oberflächen mit Verunreinigungen aus der Luft ändern. Es ist daher zweckmäßig, die gut präparierten Probenträger im Vakuum oder unter sauberem Schutzgas zu lagern.

#### Patentansprüche

1. Probenträger für die massenspektrometrische Analyse von großen organischen Molekülen, die in Tröpfchen eines Lösungsmittels auf den Probenträger aufgebracht und dort zusammen mit Matrixmaterial für eine Ionisierung durch matrixunterstützte Laserdesorption eingetrocknet werden, **dadurch gekennzeichnet**, daß sich auf einer sonst hydrophoben, ebenen Oberfläche des Probenträgers kleine ionenaustauschende Ankerbereiche für die aufzubringenden Probentropfen befinden.
2. Probenträger nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die ionenaustauschenden Ankerbereiche einen Durchmesser zwischen 100 und 500 Mikrometern haben.
3. Probenträger nach einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß er in etwa die Größe und Form einer Mikrotiterplatte besitzt und daß die ionenaustauschenden Ankerbereiche ein Raster bilden, das dem quadratischen Grundraster von 9 Millimetern für die Einzelgefäße einer Mikrotiterplatte oder einem daraus durch ganzzahlige Teilung entstandenen feineren Raster entspricht.
4. Probenträger nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß in die ionenaustauschenden Ankerbereiche ein Stützgerüst aus Metallpulver eingearbeitet ist.
5. Verfahren zur Herstellung eines Probenträgers nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß zunächst ein Probenträger mit hydrophober, ebener Oberfläche und hydrophilen Ankern hergestellt wird, und daß die hydrophilen Anker durch Aufbringen von ionenaustauschendem Material in ionenaustauschende Oberflächenbereiche umgewandelt werden.
6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß auf die hydrophilen Ankerbereiche Schichten aus Ionenaustauscherpartikeln oder -membranen aufgeklebt werden.
7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß in die Schichten aus Ionenaustauschermaterial Metallpartikel eingelagert werden.

---

Hierzu 1 Seite(n) Zeichnungen

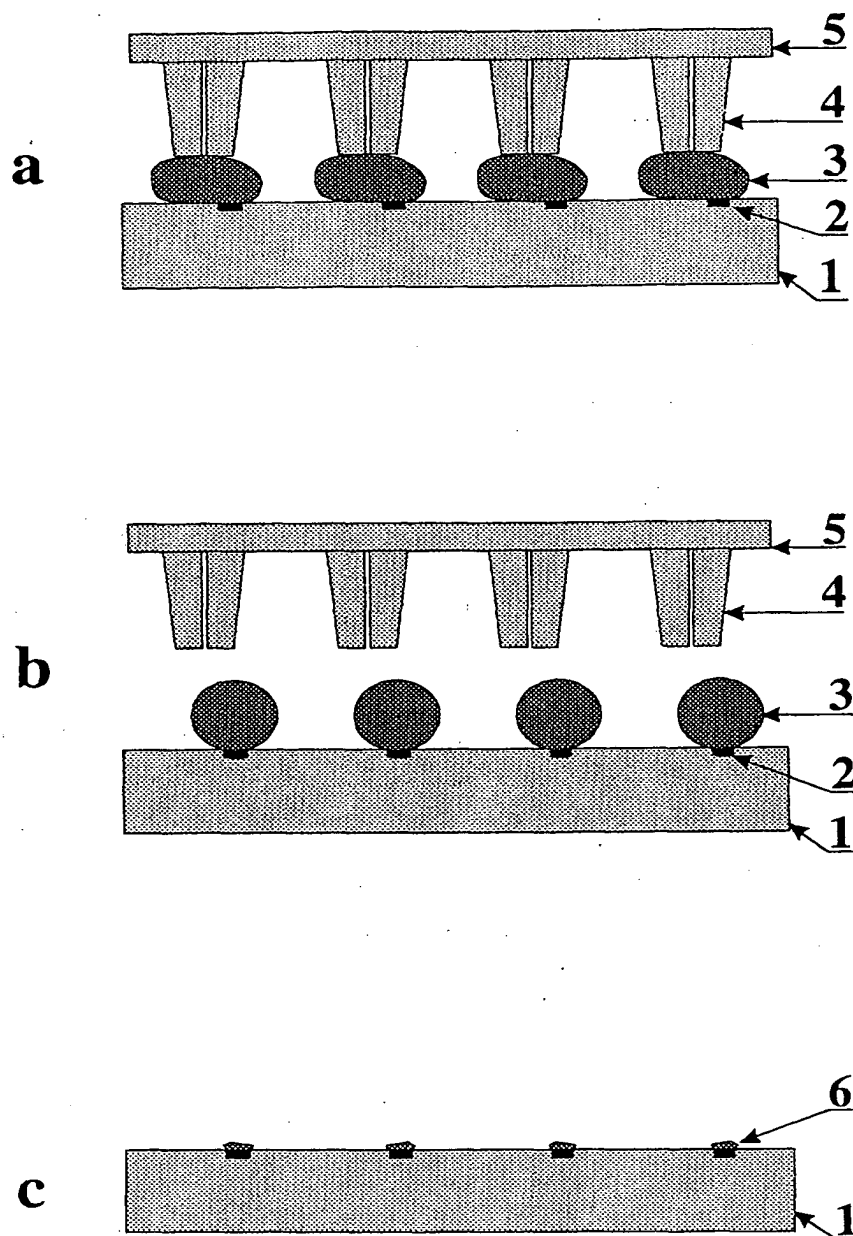
---

55

60

65

- Leerseite -



Figur 1